

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-56360

(43) 公開日 平成11年(1999) 3月2日

(51) Int.Cl. ⁴	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A
A 0 1 H 1/00		A 0 1 H 1/00	A
// C 1 2 M 1/42		C 1 2 M 1/42	
C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 13/00	
13/00		5/00	C
審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 4 頁)			
(21) 出願番号	特願平9-230666	(71) 出願人	390025793
(22) 出願日	平成9年(1997) 8月27日		岩手県 岩手県盛岡市内丸10番1号
		(72) 発明者	江井 仁 岩手県北上市新穀町1丁目6番地27 メル ベイユ北上1-304号
		(72) 発明者	神崎 洋之 岩手県北上市村崎野16地割166番地1 プ リンセス1-201号
		(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔 (外2名)

(54) 【発明の名称】 エレクトロポレーションによる遺伝子導入法

(57) 【要約】

【解決手段】 植物組織片又はカルスにエレクトロポレーションにより外来遺伝子を導入する方法であって、エレクトロポレーションを特定の条件で行うこと又は植物組織片又はカルスを浸透圧調整剤及び／又は細胞間解離酵素を含む溶液中に浸漬した後にエレクトロポレーションを行うことを特徴とする遺伝子導入法。

【効果】 従来のエレクトロポレーション法よりも簡易かつ迅速に外来遺伝子を導入した植物を得ることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 植物組織片又はカルスにエレクトロポレーションにより外来遺伝子を導入する方法であって、エレクトロポレーションを下記の条件で行うことを特徴とする遺伝子導入法。

- (1) 電場強度を50～500 V/cm；
- (2) 電気パルスの長さを30～200msec；
- (3) 印加回数を5～25回；

【請求項2】 植物組織片又はカルスにエレクトロポレーションにより外来遺伝子を導入する方法であって、植物組織片又はカルスを浸透圧調整剤及び／又は細胞間解離酵素を含む溶液中に浸漬した後にエレクトロポレーションを行うことを特徴とする遺伝子導入法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、植物細胞をプロトプラスト化することなく、エレクトロポレーションにより外来遺伝子を導入する方法に関する。この遺伝子導入法は、プロトプラスト化処理が不要なので、従来の方法に比較し、簡易かつ迅速に外来遺伝子を導入した植物体を得ることができる。

【0002】

【従来の技術】植物に外来遺伝子を導入する方法としては、プロトプラストと外来遺伝子を含む適当な培養液にポリエチレングリコールを加える方法、デキストラン硫酸を加える方法、及びポリカチオンを加える方法等が知られている。また、アグロバクテリウムを用いる方法、パーティクルガンを用いる方法等も知られている。

【0003】これらの遺伝子導入法のほかに、エレクトロポレーション法と呼ばれる方法もある。これは、電気刺激により細胞膜の透過性を亢進し、それにより細胞内に外来遺伝子を導入する方法である。この方法は、広範な生物種に利用でき、また、遺伝子の導入効率も比較的良好ことから広く利用されているが、幾つか問題点もある。

【0004】その一つが、プロトプラスト化の問題である。即ち、従来のエレクトロポレーション法では、エレクトロポレーション処理に先立ち、植物細胞をプロトプラスト化することが必要である。しかし、植物の細胞から酵素処理によってプロトプラストを調製することは操作が煩雑な上、エレクトロポレーションにより細胞が壊れ易いこと及び植物体に再分化させるために長期の培養操作が必要になることなどの欠点がある。プロトプラスト化せずに植物細胞に直接遺伝子を導入できれば上記の欠点は解消するが、従来のエレクトロポレーション法ではそのようなことは不可能であった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、このような従来のエレクトロポレーション法の問題を解決することをその目的とするものであり、より具体的には、プロプ

ラスト化せずに、直接植物細胞に外来遺伝子を導入することのできるエレクトロポレーション法を提供することを目的とする。

【0006】

【発明を解決するための手段】本発明者らは、このような課題を解決すべく鋭意検討した結果、従来のエレクトロポレーション法よりも電場強度を弱くし、電気パルスの長さを長くし、印加回数を増やすこと、又はエレクトロポレーションに先立ち植物組織又はカルスを浸透圧調整剤及び／又は細胞間解離酵素を含む溶液中に浸漬することにより、プロトプラスト化されていない植物細胞にもエレクトロポレーションにより外来遺伝子を導入できることを見出し、本発明を完成した。

【0007】即ち、本発明の第一は、植物組織片又はカルスにエレクトロポレーションにより外来遺伝子を導入する方法であって、エレクトロポレーションを下記の条件で行うことを特徴とする遺伝子導入法である。

- (1) 電場強度を50～500 V/cm；
- (2) 電気パルスの長さを30～200msec；
- (3) 印加回数を5～25回；

【0008】また、本発明の第二は、植物組織片又はカルスにエレクトロポレーションにより外来遺伝子を導入する方法であって、植物組織片又はカルスを浸透圧調整剤及び／又は細胞間解離酵素を含む溶液中に浸漬した後にエレクトロポレーションを行うことを特徴とする遺伝子導入法である。

【0009】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明の第一の発明では、従来のエレクトロポレーション法よりも電場強度を弱くし、電気パルスの長さを長くし、印加回数を増やして行う。具体的には、電場強度を50～500 V/cm、電気パルスの長さを30～200msec、印加回数を5～25回とする。このような条件でエレクトロポレーションを行うことにより、プロトプラスト化されていない植物細胞へ外来遺伝子を導入することができる。

【0010】本発明の第二の発明では、エレクトロポレーションに先立ち、植物組織又はカルスを浸透圧調整剤及び／又は細胞間解離酵素を含む溶液中に浸漬する。このような処理により植物組織片又はカルスから細胞が解離し、さらに細胞膜が細胞壁から離れ、原形質分離を起こす。この状態の細胞と導入しようとする外来遺伝子を含むベクターを共存させると、そのベクターが原形質分離を起こした細胞の細胞壁と細胞膜の間に入りこみ、極めて細胞内に侵入しやすい状態になると考えられる。ここで使用する浸透圧調整剤としては、マンニトール、ソルビトール、サッカロースなどを挙げることができる。浸透圧調整剤の溶液中の濃度は使用する浸透圧調整剤の種類により異なるが、例えば、マンニトールであれば5～15%とするのが好ましい。使用する細胞間解離酵素としては、ペクトリアーゼ(Y23)、マセロザイム(R

10)、ペクチナーゼ、Rohment P5などを挙げる事ができる。細胞間解離酵素の溶液中の濃度は使用する細胞間解離酵素の種類により異なるが、例えば、ペクトリアーゼであれば0.1～1%とするのが好ましい。植物組織又はカルスを前記溶液に浸漬する時間は、細胞の解離と原形質分離が起こり得る範囲内であれば特に限定されないが、15分～5時間とするのが好ましい。

【0011】本発明で使用する植物組織又はカルスとしては、適切な培養操作により植物体へ再分化し得る能力のあるものであればどのようなものでもよく、例えば、種子胚、生頂点、胚様体カルスなどを挙げる事ができるが、これらに限定されるわけではない。また、植物の種類は、特に限定されず、穀物類、野菜類、花卉類、果樹類、等に広く適用できる。

【0012】本発明の遺伝子導入法により導入できる遺伝子は特に限定されず、例えば、 β -1,3-グルクロニダーゼ遺伝子(GUS遺伝子)、ハイグロマイシンフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子などを導入することができる。なお、本実施例では、外来遺伝子としてレポーター遺伝子であるGUS遺伝子を使用しているが、本発明で使用する外来遺伝子がこれに限定されるわけではない。

【0013】外来遺伝子が導入された植物細胞は、外来遺伝子あるいはその発現産物の解析により選択することも可能であるが、より効率的な選択のためには、外来遺伝子とともにマーカー遺伝子を導入することが好ましい。マーカー遺伝子としては、抗生物質耐性遺伝子、例えば、ハイグロマイシンに対する抵抗性を付与するハイグロマイシンフォスフォトランスフェラーゼ(hpt)遺伝子、ピアラフォスに対する抵抗性を付与するフォスフィノチリシンアセチルトランスフェラーゼ(bar)遺伝子などを導入することができる。マーカー遺伝子は外来遺伝子と同一のベクターに組み込んでもよく、別のベクターに組み込んでもよい。別々のベクターとした場合は両ベクターを共存した状態で植物細胞に導入するいわゆるco-transformation法を用いるのが好ましい。外来遺伝子及びマーカー遺伝子を組み込むベクターとしては、それらの遺伝子を特定時期あるいは特定環境下で発現させるプロモーター配列及び遺伝子の転写を終結させるためのターミネーター配列を有するものであればどのようなものでもよく、例えば、市販のpUC19などpUC系ベクターを用いることができるが、これに限定されるわけではない。

【0014】外来遺伝子を含むベクター(場合によってはマーカー遺伝子を含むベクター)は、植物組織片又はカルスとともにエレクトロポレーション装置のキュベット内に入れる。このときベクターの量は10～100 μ gとするのが好ましいが、これに限定されるわけではない。また、キュベット内に入れる植物組織片又はカルスは5～20個が好ましいが、これに限定されるわけではない。

い。

【0015】エレクトロポレーション後の植物組織又はカルスは常法に従って再分化する。このときマーカー遺伝子として抗生物質耐性遺伝子を導入した場合には培地中にその抗生物質を添加しておくことが好ましい。これにより遺伝子が導入された細胞を効率的に選抜することができる。得られる植物体に外来遺伝子が導入されているかどうかは、その植物体からゲノムDNAを抽出し、公知のPCR法やサザン法などにより確認することができる。

【0016】

【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの実施例によって限定されるものではない。

〔実施例1〕 イネの胚組織へのトランジェントアッセイ

イネ(*Oryza sativa* L. var ササニシキ)の玄米を1%次亜塩素酸ナトリウム溶液に20分浸漬して滅菌した後、30℃で一晩浸水下で培養し、培養後の玄米から胚の部分を摘出した。摘出した胚を10%マンニトール及び0.1%ペクトリアーゼY23を含む溶液中に浸漬した。溶液中には、hpt 遺伝子を含むプラスミドDNA、及びGUS遺伝子を含むプラスミドDNAをそれぞれ30～100 μ g添加しておいた。

【0017】30分浸漬した後、胚組織及びプラスミドDNAを含む溶液を遺伝子導入装置のキュベットに入れ、エレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーションは、電場強度を200～300V/cm、電気パルスの長さを50msec、パルス印加回数を10～15回として行った。また、胚組織は、1キュベット当たり10個入れた。

【0018】エレクトロポレーション後、胚を3%サッカロース、2mg/l 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、及び30mg/lハイグロマイシンを含む液体N6培地にて培養した。培養経過後、遺伝子が導入された組織細胞部位より脱分化した細胞が遊離してきた。この培地中にはハイグロマイシンが含まれているので、hpt 遺伝子が導入された細胞のみが増殖した。増殖した細胞をさらに50mg/lのハイグロマイシンを含む培地で2回以上選抜することで遺伝子導入された細胞のみを得た。これらの細胞を50mg/lのハイグロマイシン、2mg/lベンジルアミノプリン、1mg/lナフタレン酢酸を含むN6固形培地上に置床した。その後再分化された植物体を拾うことで遺伝子導入された植物体を得られた。

【0019】得られた植物体の葉1gより、尿素-フェノール法(Cell 35:225,1983)によりゲノムDNAを抽出した。このゲノムDNAを鋳型とし、hpt 遺伝子に特異的なプライマーを用いてPCRを行った。PCRはTo ki et al (1992)の方法に基づいて行った(94℃, 1min; 60℃, 2min; 72℃, 2min; 35cycles)。PCR産物をアガロース電気泳動により解析した結果、1.3kbの増

幅断片が検出され、導入遺伝子の存在が確認された。

【0020】一方、エレクトロポレーションから1日間そのままの状態に培養した後、GUS活性によるトランジェントアッセイを行い、GUS遺伝子の導入を確認した。GUS活性によるトランジェントアッセイは、Jeffersonらの方法(EMBO, J. 6:3901, 1987)に基づいて行った。即ち、クロロフィルをメタノールにより除去した組織切片を50mM NaPO₄ (pH7.0), 0.2mM 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-グルクロニド (X-Gluc), 0.1mM-フェロシアン化カリウム、0.1mM-フェリシアン化カリウムとの混合物中で処理し、遊離する青色色素 (indigo) を指標として遺伝子の導入を確認した。

【0021】〔実施例2〕 リンドウの葉片におけるトランジェントアッセイ

リンドウ (品種WSP3、ボラーノホワイト、イーハトーヴオ、アルビレオ) をMS-ホルモン無添加培地で育成し、その植物体から葉片を約5mm幅に切り取り、これを10%マンニトール及び1%マセロザイムを含む溶液に浸漬した。溶液中にはGUS遺伝子を含むプラスミドDNAを30~100μg 添加しておいた。

【0022】30分浸漬した後、葉組織及びプラスミドDNAを含む溶液を遺伝子導入装置のキュベットに入れ、エレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーションは、電場強度を200~300V/cm、電気パルスの長さを50msec、パルス印加回数を10~15回として行った。また、葉組織は1キュベット当たり10個入れた。

【0023】エレクトロポレーションから1日間そのままの状態に培養した後、GUS活性によるトランジェントアッセイを行い、GUS遺伝子の導入を確認した。GUS活性によるトランジェントアッセイは、実施例1と同様にして行った。

【0024】〔実施例3〕 リンゴの葉片におけるトランジェントアッセイ

リンゴ (品種「ふじ」及び「ジョナゴールド」) をShoot Proliferation Medium (SPM: MS basal medium, 6-benzyladenine (BA) 1mg/L, 0.8% agar) で育成し、その植物体から葉片を約5mm幅に切り取り、これを10%マンニトール及び1%マセロザイムを含む溶液に浸漬した。溶液には、GUS遺伝子を含むプラスミドDNAを30~100μg 添加しておいた。

【0025】30分浸漬した後、葉組織及びプラスミドDNAを含む溶液を遺伝子導入装置のキュベットに入れ、エレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーションは電場強度を200~300V/cm、電気パルスの長さを50msec、パルス印加回数を10~15回として行った。葉組織は、1キュベット当たり10個入れた。エレクトロポレーションから1日間そのままの状態に培養した後、GUS活性によるトランジェントアッセイを行い、GUS遺伝子の導入を確認した。GUS活性によるトランジェントアッセイは実施例1と同様にして行った。

【0026】〔実施例4〕 トルコギキョウの実生におけるトランジェントアッセイ

トルコギキョウ (*Eustoma grandiflorum* Shinn、品種：グローリーホワイト、あずまの紫) の種子を5%アンチホルミンで3~5分間殺菌し、滅菌水で十分すすいだ後、75mlの発芽培地 (多量無機塩1/2 ムラシゲススクーグ [Murashige et al., 1962; 以後MSと略す] 培地、1.5%ショ糖) を入れたフラスコ (300ml) 中に播種し、液体振盪培養を行った。種子は約100μl (約1000個の種子を含む) 播いた。播種後3~4週間目の実生を0.5~1cmの長さに切断し、これを10%マンニトール及び1%マセロザイムを含む溶液に浸漬した。溶液には、GUS遺伝子を含むプラスミドDNAを30~100μg 添加しておいた。

【0027】30分浸漬した後、胚組織及びプラスミドDNAを含む溶液を遺伝子導入装置のキュベットに入れ、エレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーションは電場強度を200~300V/cm、電気パルスの長さを50msec、パルス印加回数を10~15回として行った。また、実生はキュベットあたり10個入れた。エレクトロポレーションから1日間そのままの状態に培養した後、GUS活性によるトランジェントアッセイを行い、GUS遺伝子の導入を確認した。GUS活性によるトランジェントアッセイは実施例1と同様にして行った。

【0028】

【発明の効果】本発明は、植物細胞をプロトプラスト化することなく、エレクトロポレーションにより外来遺伝子を導入する方法を提供する。この方法により、従来よりも簡易かつ迅速に外来遺伝子を導入した植物を得ることができる。